昆虫学报 *Acta Entomologica Sinica*, July 2016, 59(7): 747 – 758 doi:10.16380/j.kcxb.2016.07.007

DNA 条形码技术对重大潜在入侵害虫大洋臀纹粉蚧的鉴定有效性研究

王玉生[1], 周　培[2], 田　虎[1], 万方浩[1,3], 张桂芬[1,*]

(1. 中国农业科学院植物保护研究所, 植物病虫害生物学国家重点实验室, 北京 100193;
2. 无锡出入境检验检疫局, 江苏无锡 214001; 3. 青岛农业大学农学与植物保护学院, 山东青岛 266109)

摘要:【目的】粉蚧是一类重要的世界性检疫性害虫,对果蔬产业以及水果的进出口贸易造成了巨大威胁。通常,口岸截获的粉蚧多为若虫或残体,加之隐存种的存在和较小的近缘种间差异,严重影响了基于形态学特征的粉蚧类害虫识别鉴定的准确性和及时性。本研究旨在明确 DNA 条形码技术对重大潜在入侵害虫大洋臀纹粉蚧 *Planococcus minor* (Maskell)的鉴定有效性。【方法】以旅检截获的 36 头大洋臀纹粉蚧为对象、其近缘种柑橘臀纹粉蚧 *Pl. citri* (Risso)为参照,以线粒体 *COI* 基因 5′端和 3′端序列以及核糖体 28S rDNA D2-D3 区段序列为分子标记进行比对分析,以 K-2-P 模型计算种内种间遗传距离,以最大似然法(maximum likelihood, ML)构建进化树并进行系统发育分析,同时利用 SpeciesIdentifier 物种识别软件评价 3 种基因片段对大洋臀纹粉蚧的鉴定效果。【结果】当分别以 *COI* 基因 5′端和 3′端序列为分子标记时,截获大洋臀纹粉蚧的碱基序列与 NCBI 中大洋臀纹粉蚧的序列一致性分别为 100% 和 99% ~100%,而与近缘种柑橘臀纹粉蚧 *COI* 基因 5′端和 3′端的核苷酸序列一致性分别为 97% ~98% 和 96% ~98%;且大洋臀纹粉蚧和柑橘臀纹粉蚧分别存在 5 个和 11 个稳定的物种特异性识别位点;系统发育分析显示,截获的大洋臀纹粉蚧均与数据库中的大洋臀纹粉蚧聚为一支。当以 28S rDNA D2-D3 区段序列为分子标记时,臀纹粉蚧属各物种间高度保守,无法区分大洋臀纹粉蚧与其近缘种柑橘臀纹粉蚧;种间遗传距离仅为 0.004。此外,物种识别软件评价结果显示,基于 *COI* 基因 5′端和 3′端序列的鉴定结果完全正确,而基于 28S rDNA D2-D3 区段序列的鉴定结果却存在 45.2% ~61.9% 的模糊鉴定。【结论】基于 *COI* 基因 5′端和 3′端的 DNA 条形码技术完全可用于大洋臀纹粉蚧的快速准确鉴定及检测,对有效阻截其入侵和进一步扩散蔓延意义重大。

关键词: 大洋臀纹粉蚧; 柑橘臀纹粉蚧; DNA 条形码技术; *COI* 基因; 28S rDNA; 近缘种

中图分类号: Q966　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 0454-6296(2016)07-0747-12

Validity of DNA barcoding in identification of *Planococcus minor* (Maskell) (Hemiptera: Pseudococcidae), a potential major invasive alien species to China

WANG Yu-Sheng[1], ZHOU Pei[2], TIAN Hu[1], WAN Fang-Hao[1,3], ZHANG Gui-Fen[1,*] (1. State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China; 2. Wuxi Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Wuxi, Jiangsu 214001, China; 3. College of Agriculture and Plant Protection, Qingdao Agricultural University, Qingdao, Shandong 266109, China)

Abstract:【Aim】Mealybugs are one of the most important quarantine pests that injury a variety of tropical fruits and vegetables worldwide. Usually, mealybugs intercepted in the quarantine inspection include eggs, nymphs or debris, and there exist several cryptic species and small difference in related

基金项目: 公益性行业(农业)科研专项(201103026); 公益性行业(环保)科研专项(201409061); 国家"973"计划项目(2009CB119200); 江苏出入境检验检疫局科研项目(2015KJ51)

作者简介: 王玉生, 男, 1989 年 10 月生, 山东临沂人, 硕士研究生, 研究方向为入侵生物分子生态学, E-mail: yushengwang01@163.com

* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: guifenzhang3@163.com

收稿日期 Received: 2016-03-07; 接受日期 Accepted: 2016-06-19

species, which make them difficult to be identified by traditional morphological identification methods correctly and timely. In this study, the validity of DNA barcoding in identification of *Planococcus minor* (Maskell), a potential major alien invasive species to China, was evaluated. 【Methods】The 5′- and 3′-end of the mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I (COI) gene and 28S ribosomal DNA (rDNA) of 36 individuals of *Pl. minor* intercepted during passenger inspection were amplified using universal primers, and *Pl. citri* (Risso), a related species of *Pl. minor*, from Langfang, Hebei used as a reference. The obtained partial fragment of 5′- and 3′-end of *COI* gene and D2-D3 fragment of 28S rDNA were sequenced. The phylogenetic tree was established by using a maximum likelihood (ML) method. The intra- and inter-species genetic distances were calculated using the Kimura-2-Parameter model. Meanwhile, the validity of *Pl. minor* identification based on the above three gene fragments was tested with SpeciesIdentifier software. 【Results】When the 5′- and 3′-end of *COI* gene of *Pl. minor* were sequenced and BLAST, respectively, the nucleotide sequence identity between the fragments from GenBank and our study is 100% and 99% –100%, respectively. The nucleotide sequence identity of the 5′- and 3′-end of *COI* gene between *Pl. minor* and *Pl. citri* is 97% –98% and 96% –98%, respectively. There are 5 and 11 stable species-specific identification sites in the fragments of the 5′- and 3′-end of *COI* gene for *Pl. minor* and *Pl. citri*, respectively. Phylogenetic analysis indicated that *Pl. minor* intercepted during passenger inspection and those from the NCBI clustered in a clade. The sequencing results showed that the D2-D3 fragment of 28S rDNA among species belonging to the genus *Planococcus* has high conservation and that it could not be used to distinguish between *Pl. minor* and *Pl. citri*. The genetic distance between the two species is 0.004. The results based on the software of SpeciesIdentifier showed that the species identification based on 5′- and 3′-end of *COI* gene was completely correct, while that based on D2-D3 fragment of 28S rDNA resulted in 45.2% –61.9% of fuzzy identification. 【Conclusion】Our results suggest that DNA barcoding technique based on 5′- and 3′-end of *COI* gene can be used to identify and detect *Pl. minor* rapidly and accurately. The technique will be significant in intercepting and blocking the further spreading of *Pl. minor*.

Key words: *Planococcus minor*; *Planococcus citri*; DNA barcoding; *COI* gene; 28S rDNA; related species

粉蚧科(Pseudococcidae)昆虫种类多,据ScaleNet统计,有266属约2 000种(García *et al.*, 2016)。粉蚧体形微小、寄主范围广、隐蔽性强,极易随国际贸易传播扩散,给农林业生产带来了巨大威胁(Hardy *et al.*, 2008)。目前,已有6种粉蚧被列入《中华人民共和国进境植物检疫性有害生物名录》,包括扶桑绵粉蚧 *Phenacoccus solenopsis* (Tinsley)、大洋臀纹粉蚧 *Planococcus minor* (Maskell)、南洋臀纹粉蚧 *Pl. lilacinus* (Cockerell)、新菠萝灰粉蚧 *Dysmicoccus neobrevipes* (Beardsley)、木薯绵粉蚧 *Ph. Manihoti* (Matile-Farrero)以及香蕉灰粉蚧 *D. grassi* (Leonardi)。水果是截获粉蚧的主要载体,占总截获量的99.0%(顾渝娟等, 2015)。我国大陆进口水果的主要来源地有中国的台湾、香港以及东南亚等区域,而这些区域不仅是粉蚧疫情的高发区(李今中等, 2009; 顾渝娟等, 2015; 黄蓬英等, 2015),也是大陆游客重要的旅游目的地或中转地。近年来,我国口岸粉蚧疫情逐年加重,呈现货检与旅检并重的态势(顾渝娟等, 2013a)。其中,南洋臀纹粉蚧、大洋臀纹粉蚧等的截获量最大,分别为近年总截获量的40.3%和34.5%(顾渝娟等, 2015),传入我国的风险极大(顾渝娟等, 2013a, 2013b)。

通常,口岸截获的粉蚧多为若虫或残体(Ashfaq *et al.*, 2010; Pieterse *et al.*, 2010; Singh *et al.*, 2012),加上隐存种和近缘种的存在(Hodgson *et al.*, 2008; Rung *et al.*, 2008; Chu*et al.*, 2009; He *et al.*, 2012),严重制约了粉蚧形态学识别鉴定的准确性和及时性。Hebert等(2003)提出以基于线粒体COI (mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I)基因中一段特定区域的DNA条形码技术对生物进行种类鉴定。之后,基于 *COI* 基因(Park *et al.*, 2011)或与核糖体28S rDNA (Pacheco da Silva *et al.*, 2014)、转录间隔区(internal transcribed spacer, ITS)(Pacheco da Silva *et al.*, 2014)、延伸因子-1α 亚基(elongation factor 1 alpha, EF-1α)基因等核基因(Rung *et al.*, 2009)进行联合分析的DNA条形码技术在粉蚧的识别鉴定研究中得到了普遍应用(Abd-Rabou *et al.*,

2012）。如，Park 等（2010）针对条形码通用型引物对介壳虫扩增效率低下的问题，设计了一对通用性更强的 *COI* 引物；并利用该对引物验证了 *COI* 基因在粉蚧科和盾蚧科物种鉴定中的可行性（Park *et al.*, 2011）。Malausa 等（2011）通过比较已报道的通用型引物对粉蚧的扩增效率，以及 *COI*（5′和 3′端）、*ITS*2、28S rDNA D2 区段、内共生菌 *Tremblaya princeps* 基因片段等在粉蚧种类鉴定中的准确性，提出将线粒体 *COI* 基因与核基因、内共生菌基因等联合分析能显著提高物种鉴定的准确性和成功率（Abd-Rabou *et al.*, 2012）。Pieterse 等（2010）采用基于 *COI* 基因 3′端的 DNA 条形码技术，对南非出口的柑橘类水果中携带的包括柑橘臀纹粉蚧 *Pl. critri*（Risso）在内的 5 种粉蚧的卵、若虫和成虫进行了准确鉴定。Pacheco da Silva 等（2014）则利用 *COI* 基因 3′端、28S rDNA D2 区、*ITS*2、内共生菌 *T. princeps* 基因序列结合形态学分析，对巴西葡萄园的 17 种粉蚧标本进行了准确鉴定，并开发了其中 5 种粉蚧的快速检测试剂盒。

大洋臀纹粉蚧是国际广泛关注的重要检疫性害虫，寄主范围广，超过 80 科 190 属 250 种植物，是热带和亚热带水果、蔬菜、花卉等的重要害虫（Bastos *et al.*, 2007; García *et al.*, 2016），主要分布在我国的台湾和香港以及东南亚国家（Williams, 1982; García *et al.*, 2016）。大洋臀纹粉蚧首次于 2008 年在沈阳旅检水果中被截获（付海滨等，2008），之后被截获的频次逐年攀升，目前已成为我国口岸截获量最大的粉蚧种类（顾渝娟等，2015），传入我国的风险极大（齐国君等，2015）。如 2015 年共计截获 1 904 次，其中货检和旅检各占 69.1% 和 30.9%。且大洋臀纹粉蚧与经常截获的本地分布种柑橘臀纹粉蚧形态上极其相似，难以进行有效区分（Cox, 1989），极大影响了通关效率。目前，大洋臀纹粉蚧已在我国广东、海南、云南（何衍彪等，2011；王进强等，2013）等局部区域发现，给我国的农林业生产带来了严重威胁。因此，研究建立快速准确的大洋臀纹粉蚧鉴定技术体系及其远程数据库识别系统，是加强口岸货物检疫以及旅客携带物检疫的基本前提。

本研究以口岸旅检截获的大洋臀纹粉蚧为对象、其近缘种柑橘臀纹粉蚧为参照，以线粒体 *COI* 基因 5′端和 3′端片段以及核糖体 28S rDNA D2-D3 区段为分子标记，探讨了 DNA 条形码技术在粉蚧识别鉴定中的有效性，为实现口岸粉蚧类害虫的快速鉴定和准确识别提供技术支撑。

1　材料与方法

1.1　供试虫源

本研究所使用的大洋臀纹粉蚧标本分别由无锡出入境检验检疫局、高明出入境检验检疫局和广州机场出入境检验检疫局等赠送，均为入境旅客携带水果上的截获标本，旅客来源地包括中国的香港和台湾，以及马来西亚、新加坡等国家，详细信息如表 1 所示。柑橘臀纹粉蚧标本采自中国农业科学院廊坊科研中试基地，寄主植物为南瓜 *Cucurbita moschata* Duch.。粉蚧标本浸于无水乙醇（分析纯）中，−20℃保存备用。

1.2　DNA 提取

粉蚧类昆虫 DNA 的提取，参照石晶等（2005）的 SDS 法并稍加改进（王玉生，2016）。

1.3　PCR 扩增、电泳检测及序列测定

以文献报道的粉蚧通用引物组合 PCOF/LepR1（Park *et al.*, 2010）、CJ-J-2183/3014.3R（Rung *et al.*, 2008）和 28SF/28SR（Dietrich *et al.*, 2001），分别对旅检截获的大洋臀纹粉蚧和参照标本柑橘臀纹粉蚧的 *COI* 基因 5′端和 3′端及 28S rDNA D2-D3 区段进行扩增，各引物具体信息如表 2 所示，引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。PCR 反应体系为 25 μL：模板 DNA 1.5 μL，10 × Buffer 2.5 μL（含 Mg^{2+}），dNTPs 0.4 μL（10 mmol/L），上游引物和下游引物各 0.4 μL（10 μmol/L），*Taq* 酶 0.4 μL（2.5 U/μL），ddH_2O 19.4 μL。扩增反应在 Veriti™ 96-well Thermal Cycler 上进行。

取 5 μL PCR 扩增产物在含有 Gold viewII 的 1.0% 琼脂糖凝胶上以 100 V 电泳分离 45 min，然后，以凝胶成像系统分析电泳结果。最后，将经电泳检验合格的 PCR 产物直接送北京三博远志生物技术有限公司进行双向测序。其中，大洋臀纹粉蚧共计检测 36 头；柑橘臀纹粉蚧检测 6 头（其中雌成虫 3 头、若虫 3 头）。

1.4　序列处理与分析

以 MEGA5.22（Tamura *et al.*, 2011）和 DnaSP5.10.01（Librado and Rozas, 2009）软件分别进行序列校正、拼接、多序列比对和单倍型多样性分析。然后对 *COI* 基因 5′端和 3′端及 28S rDNA D2-D3 片段的所有单倍型进行 BLAST，分析其与 NCBI 数据库（其中 BOLD 数据库中的所有序列均已在 NCBI

表 1　旅检截获的大洋臀纹粉蚧标本的具体信息

Table 1　Details of *Planococcus minor* intercepted during passenger inspection

编号 No.	虫态 Developmental stage	寄主种类 Host species	来源地 Origin	截获口岸 Intercepting port	日期 Date	序列登录号 Accession number*		
						COI 5′端 5′-end of *COI*	*COI* 3′端 3′-end of *COI*	28S rDNA D2-D3
1–3	若虫 Nymph	莲雾 *Syzygium samarangense* (Blume) Merrill & LM Perry	台北 Taipei	无锡出入境检验检疫局 Wuxi Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau	2015-02-10	DYTWFJ. 2015. 999079.5.1–13	DYTWFJ. 2015. 999079.3.1–13	DYTWFJ. 2015. 999079.28.1–13
4	雌成虫 Female adult							
5	若虫 Nymph				2015-02-20			
6–7	雌成虫 Female adult							
8–10	若虫 Nymph				2015-03-10			
11–13	雌成虫 Female adult							
14	若虫 Nymph	山竹 *Garcinia mangostana* L.	新加坡 Singapore		2015-04-10	DYTWFJ. 2015. 999002.5.1–5	DYTWFJ. 2015. 999002.3.1–5	DYTWFJ. 2015. 999002.28.1–5
15	雌成虫 Female adult							
16–17	若虫 Nymph	火龙果 *Hylocereus undulatus* Britt			2015-04-20			
18	雌成虫 Female adult							
19–21	若虫 Nymph	释迦 *Annona squamosa* L.	香港 Hong Kong		2015-04-30	DYTWFJ. 2015. 999077.5.1–4	DYTWFJ. 2015. 999077.3.1–4	DYTWFJ. 2015. 999077.28.1–4
22	雌成虫 Female adult							
23–25	若虫 Nymph	山竹 *G. mangostana*	新加坡 Singapore	高明出入境检验检疫局 Gaoming Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau	2015-08-10	DYTWFJ. 2015. 999002.5.6–9	DYTWFJ. 2015. 999002.3.6–9	DYTWFJ. 2015. 999002.28.6–9
26	雌成虫 Female adult							
27–29	若虫 Nymph	山竹 *G. mangostana*	马来西亚 Malaysia		2015-04-10	DYTWFJ. 2015. 999004.5.1–7	DYTWFJ. 2015. 999004.3.1–7	DYTWFJ. 2015. 999004.28.1–7
30	雌成虫 Female adult							
31	若虫 Nymph				2015-04-20			
32–33	雌成虫 Female adult							
34–35	若虫 Nymph	山竹 *G. mangostana*	马来西亚 Malaysia	广州机场出入境检验检疫局 Guangzhou Airport Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau	2015-04-10	DYTWFJ. 2015. 999004.5.8–10	DYTWFJ. 2015. 999004.3.8–10	DYTWFJ. 2015. 999004.28.8–10
36	雌成虫 Female adult							

* 中国主要外来入侵昆虫 DNA 条形码识别系统 Database of Invasive Alien Species in China (http://www.chinaias.cn).

数据库中收录)中同名种的序列一致性;同时,下载臀纹粉蚧属物种的高质量序列(一致性 >92%;重叠区段:*COI* 5′端 >70%, *COI* 3′端 >85%, 28S rDNA D2-D3 >40%)(表 3),并利用 BOLD 数据库所具有的物种确证功能,依据 *COI* 基因 5′端和 3′端序列的单倍型对样本进行进一步的种类确证。以 MEGA5.22 软件中的 Kimura-2-Parameter (K-2-P)模型计算种内种间遗传距离。然后,将所测样本序列并整合 NCBI 中同名种和臀纹粉蚧属的其他 4 种粉蚧的高质量序列(每种单倍型不同地理种群选用 1 条序列)(表 3),以 NCBI 中的扶桑绵粉蚧序列(GeneBank 登录号 *COI* 5′端: AB858432, *COI* 3′端:

表 2　*COI* 基因 5′端和 3′端以及 28S rDNA 扩增引物及其主要参数

Table 2　Primers and key parameters for amplification of the 5′- and 3′-end of *COI* gene and 28S rDNA

基因片段 Gene fragment	引物名称 Primer	引物序列(5′－3′) Primer sequences	片段大小(bp) Length	退火温度(℃) Annealing temperature	参考文献 References
COI 5′端 5′-end of *COI*	PCOF LepR1	CCTTCAACTAATCATAAAAATATYAG TAAACTTCTGGATGTCCAAAAAATCA	~710	51	Park *et al*., 2010
COI 3′端 3′-end of *COI*	CJ-J-2183 3014.3R	CAACATTTATTTTGATTTTTTGG GTATGATTTAAATTAGGTGA	~840	47	Rung *et al*., 2008
28S rDNA D2-D3	28SF 28SR	AGTCGKGTTGCTTGAKAGTGCAG TTCGGGTCCCAACGTGTACG	~780	58	Dietrich *et al*., 2001

表 3　NCBI 数据库中高质量臀纹粉蚧属 *COI* 基因 5′端和 3′端及 28S rDNA 序列信息

Table 3　Sequence information of 5′- and 3′-end of *COI* gene and 28S rDNA of species belonging to the genus *Planococcus* from NCBI

物种 Species	*COI* 5′端 5′-end of *COI*		*COI* 3′端 3′-end of *COI*		28S rDNA D2-D3	
	单倍型数量 Number of haplotypes	序列条数 Number of sequences	单倍型数量 Number of haplotypes	序列条数 Number of sequences	单倍型数量 Number of haplotypes	序列条数 Number of sequences
大洋臀纹粉蚧 *Planococcus minor*	4	10	5	10	1	1
柑橘臀纹粉蚧 *Pl. citri*	13	32	8	24	1	16
葡萄绵粉蚧 *Pl. ficus*	7	10	5	6	3	5
南洋臀纹粉蚧 *Pl. lilacinus*	3	7	1	1	–	–
日本臀纹粉蚧 *Pl. kraunhiae*	3	14	1	1	–	–
柏臀纹粉蚧 *Pl. vovae*	2	2	1	1	1	2
合计 Total	32	75	21	43	6	24

KR001884, 28S rDNA：KT369516)为外群构建系统进化树,并对各分支进行 1 000 次 Bootstrap 检验。最后,利用 SpeciesIdentifier 物种识别软件(Meier *et al*., 2006)对鉴定结果进行验证。

2　结果与分析

2.1　PCR 扩增及序列分析

以旅检截获的不同虫态的大洋臀纹粉蚧为对象,柑橘臀纹粉蚧为参照,以 *COI* 基因 5′端和 3′端以及 28S rDNA D2-D3 区段的通用引物进行 PCR 扩增,无论成虫还是若虫均分别得到长度约为 710, 840 和 780 bp 的单一靶标片段。扩增片段经双向测序、拼接、比对和剪切处理后,各靶标片段大小分别为 *COI* 基因 5′端 666 bp、3′端 786 bp,28S rDNA D2-D3 片段 748 bp,并将序列提交至中国主要外来入侵昆虫 DNA 条形码识别系统(http://www.chinaias.cn),系统序列登录号如表 1。

2.2　序列单倍型和一致性分析

单倍型多样性分析结果表明(表 4),当以 *COI* 基因 5′端序列为分子标记时,旅检截获的 36 头大洋臀纹粉蚧的序列完全相同,为同一单倍型;6 头柑橘臀纹粉蚧的序列亦完全相同(中国主要外来入侵昆虫 DNA 条形码识别系统登录号：GJTWFJ. 2015. 065000. 5. 1 －6),为同一单倍型;两种粉蚧 5′端核苷酸序列的一致性为 98.2%。当以 *COI* 基因 3′端序列为分子标记时,大洋臀纹粉蚧有 6 种单倍型,而 6 头柑橘臀纹粉蚧的序列完全相同(中国主要外来入侵昆虫 DNA 条形码识别系统登录号：GJTWFJ. 2015. 065000. 3. 1 －6);两种粉蚧 3′端的序列一致性为 97.0% ~97.3%。当以 28S rDNA D2-D3 序列为分子标记时,大洋臀纹粉蚧有 3 种单倍型,柑橘臀纹粉蚧的序列完全相同(中国主要外来入侵昆虫 DNA 条形码识别系统登录号：GJTWFJ. 2015. 065000. 28. 1 －6),两种粉蚧 28S rDNA D2-D3 序列的一致性为 99.7% ~100.0%。

将本研究中获得的大洋臀纹粉蚧 *COI* 基因 5′端和 3′端的所有单倍型序列与 NCBI 中大洋臀纹粉蚧的相应序列进行比对分析(表 4),其核苷酸序列一致性分别为 100% 和 99% ~100%;与近缘种柑橘臀纹粉蚧相应核苷酸序列的一致性分别为 97% ~98% 和 96% ~98%。本研究中大洋臀纹粉蚧 28S rDNA D2-D3 片段的序列与 NCBI 的大洋臀纹粉蚧相应序列的一致性为 99% ~100%,与近缘种柑橘臀纹粉蚧相应核苷酸序列的一致性亦为 99% ~100%(表 4)。

表 4 旅检截获大洋臀纹粉蚧的单倍型及与 NCBI 数据库序列 BLAST 分析

Table 4 Haplotypes of the sequences from *Planococcus minor* intercepted during passenger inspection and their BLAST with sequences from NCBI

基因片段 Gene fragment	单倍型 Haplotype	样本编号 Sample number	与 NCBI 中一致性最高的 3 条序列的比对 Three of the Best NCBI BLAST hit			
			登录号 Access number	物种 Species	一致性(%) Identity	重叠片段长度(bp) Coverage
COI 5′端 5′-end of *COI*	H1	1 – 36	HM474320	*Pl. minor*	100	660
			HM474312		100	649
			HM474314		100	641
COI 3′端 3′-end of *COI*	H1	23 – 26,34 – 36	KJ187522	*Pl. minor*	100	742
			EU250524		100	699
			EU250520		99	715
	H2	1, 3 – 9, 12 – 13, 17, 19 – 22, 27, 29; 31 – 32	EU250520	*Pl. minor*	100	715
			EU250523		100	700
			EU250522		100	699
	H3	2, 28, 30	EU250520	*Pl. minor*	99	715
			EU250523		99	700
			EU250522		99	699
	H4	10 – 11,16,18	EU250520	*Pl. minor*	99	715
			EU250523		99	700
			EU250522		99	699
	H5	14 – 15	EU250520	*Pl. minor*	99	715
			EU250523		99	700
			EU250522		99	699
	H6	33	EU250520	*Pl. minor*	99	715
			EU250523		99	700
			EU250522		99	699
28S rDNA D2-D3	H1	1,3 – 4,8 – 9,11 – 12,15 – 19, 21,27,31 – 35	JQ651362	*Pl. citri*	100	623
			JQ651165		100	619
			JQ651164		100	583
	H2	2,5 – 7,13 – 14, 20,22 – 26, 28 – 30, 36	GU134661	*Pl. minor*	100	310
			JQ651362	*Pl. citri*	99	623
			JQ651165		99	619
	H3	10	JQ651362	*Pl. citri*	99	623
			JQ651165		99	619
			JQ651164		99	583

2.3 系统发育分析

整合 NCBI 中臀纹粉蚧属 6 种粉蚧的高质量序列,进行系统发育分析。结果显示,当分别以 *COI* 基因 5′端(图 1: A)或 3′端(图 1: B)序列为分子标记时,旅检截获的 36 头大洋臀纹粉蚧的各单倍型均与数据库中的大洋臀纹粉蚧聚为一支,分支支持率分别为 98% 和 93%;本研究中的柑橘臀纹粉蚧与 NCBI 中的柑橘臀纹粉蚧亦聚为一支,而且,臀纹粉蚧属的其他物种亦各自聚为一支,并共同构成臀纹粉蚧属分支(图 1: A 和 B)。当以 28S rDNA D2-D3 序列为分子标记时,臀纹粉蚧属的所有物种聚为一大支,但大洋臀纹粉蚧和柑橘臀纹粉蚧未能分别形成独立的分支(图 2)。

2.4 物种鉴定有效性评价

2.4.1 种内与种间遗传距离:以 MEGA5.22 软件中的 K-2-P 模型计算本研究以及数据库中大洋臀纹粉蚧和柑橘臀纹粉蚧的种内与种间遗传距离,结果表明,当以 *COI* 基因 5′端序列为分子标记时,大洋臀纹粉蚧和柑橘臀纹粉蚧的种间遗传距离为0.022;当以 *COI* 基因 3′端序列为靶分子标记时,种间遗传距离为 0.029;当以 28S rDNA D2-D3 区段序列为分子标记时,种间遗传距离为 0.004(表 5)。

2.4.2 物种位点特异性分析:对本研究以及 NCBI 中大洋臀纹粉蚧和柑橘臀纹粉蚧的所有单倍型序列进行比对分析,结果显示,无论是 *COI* 基因 5′端还是 3′端序列均存在稳定的两种臀纹粉蚧的识别位点(图 3),而 28S rDNA D2-D3 区段则无。其中,在 *COI* 基因 5′端 469 bp 的重叠序列中存在 5 个识别位点,且所有的识别位点均位于密码子第 3 位,符合密码子的摇摆性;而在 3′端 654 bp 的重叠序列中存

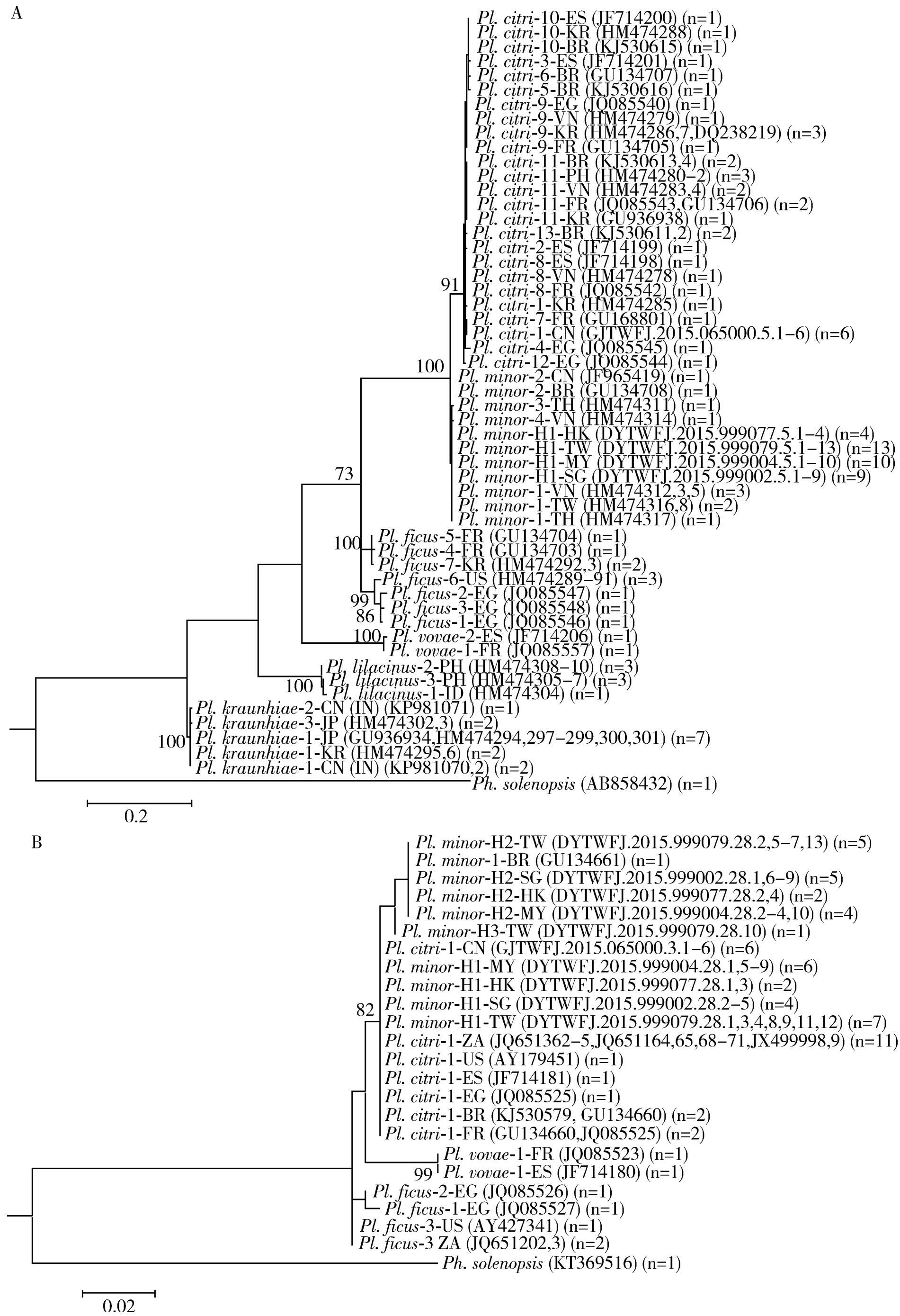


图 1　分别以 *COI* 基因 5′端（A）和 3′端（B）序列为分子标记采用最大似然法构建的系统发育树

Fig. 1　Maximum likelihood tree based on the nucleotide sequence of 5′-end（A）and 3′-end（B）of *COI* gene

分支处数值表示重复 1 000 次检测后自展值（ >70%）；标尺示遗传距离 Numbers around branches are bootstrap values（ >70%） calculated by 1 000 replicates. The scale bar indicates genetic distance. *Planococcus minor*-H1 – H6（同表4）为旅检截获的大洋臀纹粉蚧单倍型（破折号后为国家或地区缩写，括号内为中国主要外来入侵昆虫 DNA 条形码识别系统序列登录号，同表 1；n 为同一单倍型、来自同一国家或地区的序列数目，同表4）*Pl. minor*-H1 to H6（the same as in Table 4）are the haplotypes of intercepted *Pl. minor* samples during passenger inspection（The characters after the dash are the abbreviation of country or region; the accesses number of Database of Invasive Alien Species in China, the same as in Table 1, and the number of haplotypes that from the same county or area, that are all shown in the brackets）. GJTWFJ. 2015. 065000. 5/3. 1 – 6：采自河北廊坊的柑橘臀纹粉蚧 *Pl. citri* samples collected from Langfang, Hebei. 其余分支示 NCBI 数据库各物种单倍型，括号内为 GenBank 登录号，n 为同一单倍型的序列数目 Other branches represent the haplotypes of mealbug species from NCBI. The GenBank accesses numbers and number of sequences that from the same country or region sharing the same haplotype are shown in the brackets. 葡萄绵粉蚧 *Pl. ficus*；南洋臀纹粉蚧 *Pl. lilacinus*；日本臀纹粉蚧 *Pl. kraunhiae*；柏臀纹粉蚧 *Pl. vovae*；扶桑绵粉蚧 *Ph. solenopsis*；硕蚧 *M. hellenica*. VN：越南 Viet Nam；TW：中国台湾 Taiwan, China；TH：泰国 Thailand；CN 中国大陆 Mainland, China；BR：巴西 Brazil；KR：韩国 South Korea；ES：西班牙 Spain；EG：埃及 Egypt；FR：法国 France；PH：菲律宾 Philippine；US：美国 The United State of America；JP：日本 Japan；ID：印尼 Indonesia；AS：美属萨摩亚 American Samoa；TT：特立尼达和多巴哥 Trinidad and Tobago；IR：伊朗 Iran；ZA：南非 South Africa；IL：以色列 Israel；AR：阿根廷 Argentina；SG：新加坡 Singapore；HK：中国香港 Hong Kong, China；MY：马来西亚 Malaysia；IN：截获粉蚧标本的序列，无原产地信息 The intercepted samples without origin information. 图 2 同 The same for Fig. 2.

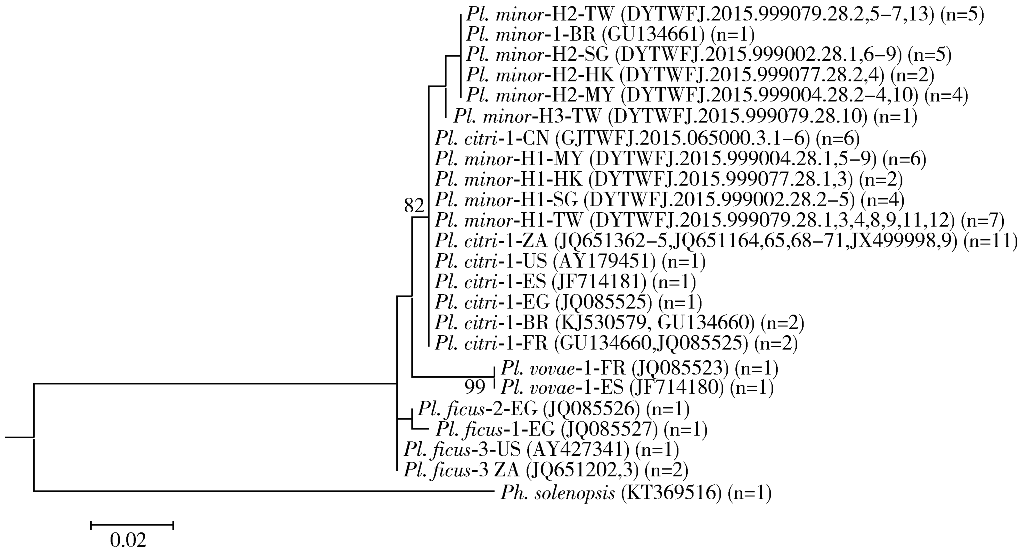


图 2 以 28S rDNA D2-D3 序列为分子标记采用最大似然法构建的系统发育树

Fig. 2 Maximum likelihood tree based on the nucleotide sequences of D2-D3 region of 28S rDNA

Planococcus minor-H1-H3：旅检截获的大洋臀纹粉蚧的单倍型 Haplotypes of intercepted *Pl. minor* samples during passenger inspection. GJTWFJ. 2015.065000.28.1-6：采自河北廊坊的柑橘臀纹粉蚧 *Pl. citri* samples collected from Langfang, Hebei.

表 5 大洋臀纹粉蚧和柑橘臀纹粉蚧种内和种间遗传距离

Table 5 Intra- and inter-species genetic distance of *Planococcus minor* and *Pl. citri*

基因片段 Gene fragment	种内 Intra-species		种间 Inter-species
	大洋臀纹粉蚧 *Pl. minor*	柑橘臀纹粉蚧 *Pl. citri*	
COI 5′端 5′-end of *COI*	0.003	0.006	0.022
COI 3′端 3′-end of *COI*	0.004	0.006	0.029
28S rDNA D2-D3	0.005	0.000	0.004

在 11 个识别位点，其中 8 个识别位点位于密码子第 3 位。进而表明，利用 *COI* 基因 5′端和 3′端的序列变异位点即能准确区分大洋臀纹粉蚧与柑橘臀纹粉蚧。

2.5 物种鉴定的准确率评价

以物种识别软件评价 *COI* 基因 5′端和 3′端以及 28S rDNA D2-D3 片段序列对大洋臀纹粉蚧和柑橘臀纹粉蚧的鉴定准确率，结果表明，当以 *COI* 基因 5′端和 3′端序列为分子标记时，3 种评价指标均显示鉴定正确率为 100.0%，且不存在鉴定错误和不匹配现象，亦即对大洋臀纹粉蚧和柑橘臀纹粉蚧的鉴定结果完全正确；而当以 28S rDNA D2-D3 片段序列为分子标记时，3 种评价指标的鉴定准确率仅为 38.1% ~54.8%，模糊鉴定比率达 45.2% ~61.9%，不存在鉴定错误和不匹配现象，无法准确区分两种臀纹粉蚧（表 6）。

表 6 基于“最佳匹配”，“最接近的匹配”和“所有物种的条形码”的物种鉴定准确率

Table 6 Species identification accuracy rate based on “best match”, “best close match” and “all species barcodes”

基因片段 Gene fragment	最佳匹配 Best match		最接近的匹配 Best close match		所有物种的条形码 All species barcodes	
	正确鉴定率(%) Rate of correct identification	模糊鉴定率(%) Rate of ambiguous identification	正确鉴定率(%) Rate of correct identification	模糊鉴定率(%) Rate of ambiguous identification	正确鉴定率(%) Rate of correct identification	模糊鉴定率(%) Rate of ambiguous identification
COI 5′端 5′-end of *COI*	100.0	0.0	100.0	0.0	100.0	0.0
COI 3′端 3′-end of *COI*	100.0	0.0	100.0	0.0	100.0	0.0
28S rDNA D2-D3	38.1	61.9	38.1	61.9	54.8	45.2

3 讨论

DNA 条形码鉴定技术不受标本完整性、发育阶段等的限制（Ashfaq *et al*., 2010；Pieterse *et al*., 2010；Singh *et al*., 2012），并且具有简便、快速、高通量等特点，为口岸进境植物检疫性有害生物的准确鉴定提供了一种快捷的技术手段。然而，由于部

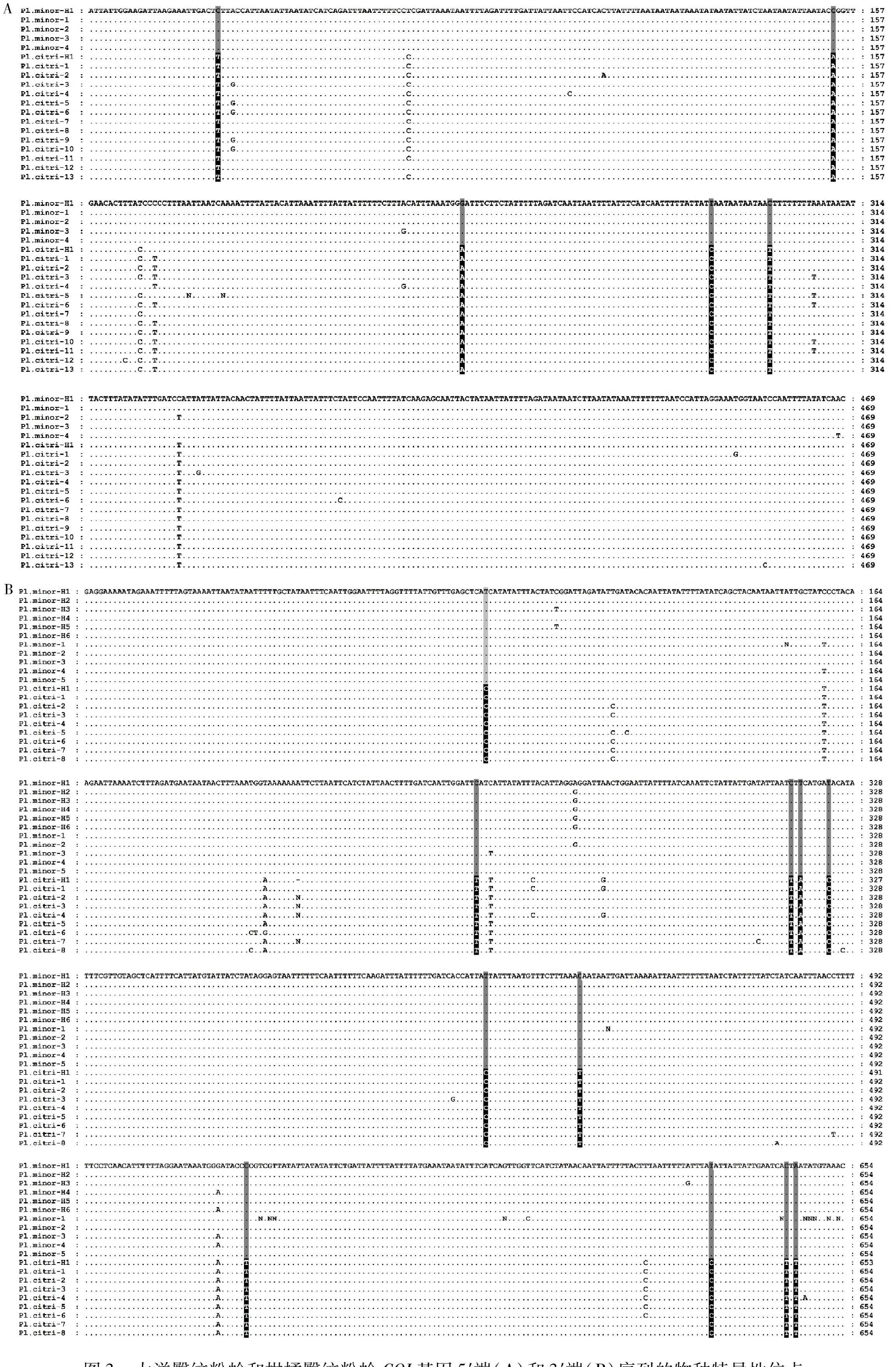


图 3　大洋臀纹粉蚧和柑橘臀纹粉蚧 *COI* 基因 5′端(A)和 3′端(B)序列的物种特异性位点

Fig. 3　Species-specific identification sites in 5′-end (A) and 3′-end (B) of *COI* gene of *Planococcus minor* and *Pl. citri*

分粉蚧存在隐存种现象，且近缘种间差异较小（Hodgson *et al.*, 2008; Rung *et al.*, 2008; Chu *et al.*, 2009; He *et al.*, 2012），因此仅使用标准的条形码区段，即 *COI* 基因 5′端序列（Hebert *et al.*, 2003），可能不能有效地进行物种区分（Moritz and Cicero, 2004），而基于多基因片段的条形码技术为检疫性害虫的准确识别与快速鉴定提供了先机（Malausa *et al.*, 2011; Abd-Rabou *et al.*, 2012; Pacheco da Silva *et al.*, 2014）。

本研究以我国 3 个口岸旅检截获的来自 4 个国家/地区、10 批次的 36 头大洋臀纹粉蚧成虫和若虫为对象，以其近缘种柑橘臀纹粉蚧为参照，研究探讨基于线粒体 *COI* 基因 5′端和 3′端序列，以及核糖体 28S rDNA D2-D3 区段的 DNA 条形码技术对潜在重大入侵害虫大洋臀纹粉蚧的鉴定准确性，结果表明，*COI* 基因 5′端和 3′端均能准确地鉴定两种近缘种粉蚧，而 28S rDNA 却无能为力。何衍彪等（2011）的研究亦发现，28S rDNA 在臀纹粉蚧属物种之间高度保守，无法用于区分大洋臀纹粉蚧与其近缘种柑橘臀纹粉蚧和葡萄绵粉蚧 *Pl. ficus*（Signoret）。而 Malausa 等（2011）的进一步研究则发现，28S rDNA D2 区和内共生菌 *T. princeps* 基因区段同样无法区分臀纹粉蚧属的种类，但 *COI* 基因 5′端和 3′端序列却迎刃而解。通常，种内与种间遗传距离及其相互关系是判别条形码序列能否准确鉴定物种的重要依据（Hebert *et al.*, 2004）。当本研究以 *COI* 基因 5′端和 3′端序列为分子标记时，大洋臀纹粉蚧和柑橘臀纹粉蚧的种间遗传距离均大于 2% 的物种判别标准（Hebert *et al.*, 2004）；虽然种间遗传距离不足种内遗传距离的 10 倍，但二者之间无交叉，进而能准确地区分两个近缘种（Aliabadian *et al.*, 2009; 刘慎思等, 2014）。然而，当以 28S rDNA D2-D3 区段序列为分子标记时，两物种的种间遗传距离小于种内遗传距离，无法对两种近缘种粉蚧进行有效区分。以物种识别软件进行进一步分析，结果显示，基于 *COI* 基因 5′端和 3′端序列的鉴定结果完全正确；而基于 28S rDNA D2-D3 区段的序列则存在高比例的模糊鉴定，无法准确区分这两种粉蚧。

大洋臀纹粉蚧和柑橘臀纹粉蚧形态极其相似（Cox, 1989），难以通过传统的形态学方法进行准确鉴定。何衍彪等（2011）发现，*COI* 基因 5′端序列的变异率相对较高，可作为臀纹粉蚧属 3 种近缘种分子鉴定的依据，并且寻找到了稳定的识别位点。我们的研究同样也发现，在 *COI* 基因 5′端和 3′端序列均存在稳定的、保守的两物种特异位点。然而，需注意的是，基于 *COI* 基因 3′端与核基因 *EF-1α* 的研究，Rung 等（2008）提出可能存在大洋臀纹粉蚧-柑橘臀纹粉蚧复合体，并将其分为大洋臀纹粉蚧分支、柑橘臀纹粉蚧分支及 Hawaiian 分支；而且，联合应用 *COI* 基因和形态学特征以及地理分布信息等能准确地区分这 3 个分支。并进而基于 *COI* 基因 3′端序列研发出了能区分 3 个分支的限制性内切酶片段长度多态性（restriction fragment length polymorphism, RFLP）检测技术（Rung *et al.*, 2009）。本研究基于 *COI* 基因 3′端构建的系统发育树中（图 1: B），大洋臀纹粉蚧形成的独立分支并与 Hawaiian 分支聚为一支（分支支持率为 54%），然后与柑橘臀纹粉蚧分支形成复合体分支，与 Rung 等（2008）的研究结果基本一致。Abd-Rabou 等（2012）则通过对 *COI* 基因 5′端的序列分析提出，柑橘臀纹粉蚧的种内遗传差异较大，可能存在隐存谱系，本研究基于 *COI* 基因 5′端和 3′端构建的系统发育树同样也存在类似的现象（图 1）。可见，在目前分类体系下，基于 *COI* 基因 5′端和 3′端序列的 DNA 条形码技术能快速准确地鉴定大洋臀纹粉蚧，并能有效地区分大洋臀纹粉蚧与其近缘种柑橘臀纹粉蚧。然而，有关两种近缘种粉蚧的准确鉴定，尚需进一步研发其他的分子标记方法，并需联合应用形态学、遗传学、行为学及生物学等多学科证据，以进一步解析大洋臀纹粉蚧与其近缘种的关系。尽管大洋臀纹粉蚧的原产地目前尚无从确证（Francis *et al.*, 2012b），然而值得提出的是何衍彪等（2011）在我国海南文昌发现的大洋臀纹粉蚧与巴西的种群为同一单倍型（图 1: A），可能来源于巴西；而且，东南亚国家是我国旅检截获大洋臀纹粉蚧的主要来源国（图 1），要严加防范。

本研究证实，基于 *COI* 基因 5′端和 3′端序列的 DNA 条形码技术完全可以用于口岸旅检粉蚧的快速准确鉴定；而 5′端和 3′端序列中靶向大洋臀纹粉蚧的稳定识别位点的发现与确定，将为后续基于 SS-COI、RFLP 标记的物种快速检测技术的研发与应用提供参考。同时，针对已在我国局部地区定殖的大洋臀纹粉蚧，应在明确其分布范围、发生危害现状以及传播扩散途径等基本情况的前提下予以彻底铲除，以防止其进一步扩散蔓延。此外，还应开展大洋臀纹粉蚧基础生物学和生态学特性研究（Francis *et al.*, 2012a），提升辐照处理等（Ravuiwasa *et al.*, 2009）检疫措施的效率，评价现有的控制技术如性

信息素(Ho *et al*., 2007; Millar, 2008)、自然天敌(Francis *et al*., 2012c)等对大洋臀纹粉蚧的防治效果,为其有效防控提供技术储备。

参考文献(References)

Abd-Rabou S, Shalaby H, Germain JF, Ris N, Kreiter P, Malausa T, 2012. Identification of mealybug pest species (Hemiptera: Pseudococcidae) in Egypt and France, using a DNA barcoding approach. *Bull. Entomol. Res*., 102(5): 515 - 523.

Aliabadian M, Kaboli M, Nijman V, Vences M, 2009. Molecular identification of birds: performance of distance-based DNA barcoding in three genes to delimit parapatric species. *PLoS ONE*, 4(1): e4119.

Ashfaq M, Noor AR, Mansoor S, 2010. DNA-based characterization of an invasive mealybug (Hemiptera: Pseudococcidae) species damaging cotton in Pakistan. *Appl. Entomol. Zool*., 45(3): 395 - 404.

Bastos CS, De Almeida RP, Vidal Neto FDC, De Araújo GP, 2007. Ocorrência de *Planococcus minor* Maskell (Hemiptera: Pseudococcidae) em algodoeiro no Nordeste do Brasil. *Neotrop. Entomol*., 36(4): 625 - 628.

Chu D, Liu GX, Fu HB, Xu W, 2009. Phylogenetic analysis of mt COI reveals the cryptic lineages in *Phenacoccus solenopsis* complex (Hemiptera: Pseudococcidae). *Acta Entomol. Sin*., 52(11): 1261 - 1265.

Cox JM, 1989. The mealybug genus *Planococcus* (Homoptera: Pseudococcidae). *Bull. Brit. Mus. (Nat. Hist.)*, *Entomol*., 58(1): 1 - 78.

Dietrich CH, Rakitov RA, Holmes JL, Black WC IV, 2001. Phylogeny of the major lineages of *Membracoidea* (Insecta: Hemiptera: Cicadomorpha) based on 28S rDNA sequences. *Mol. Phylogenet. Evol*., 18(2): 293 - 305.

Francis AW, Kairo MTK, Roda AL, 2012a. Developmental and reproductive biology of *Planococcus minor* (Hemiptera: Pseudococcidae) under constant temperatures. *Fla. Entomol*., 95(2): 297 - 303.

Francis AW, Kairo MTK, Roda AL, 2012b. Passionvine mealybug, *Planococcus minor* (Maskell) (Hemiptera: Pseudococcidae). University of Florida Extension. http://edis.ifas.ufl.edu/pdffiles/IN/IN92000.pdf.

Francis AW, Kairo MTK, Roda AL, Liburd OE, Polar P, 2012c. The passionvine mealybug, *Planococcus minor* (Maskell) (Hemiptera: Pseudococcidae), and its natural enemies in the cocoa agroecosystem in Trinidad. *Biol. Control*, 60(3): 290 - 296.

Fu HB, Wang F, Lin Y, Zhao XJ, 2008. *Planococcus minor*, a quarantine pest insect, was firstly interrupted in mainland China. *Plant Quarantine*, 22(6): 382 - 384. [付海滨, 王芳, 林颖, 赵晓军, 2008. 我国首次截获检疫性有害生物——大洋臀纹粉蚧. 植物检疫, 22(6): 382 - 384]

García Morales M, Denno BD, Miller DR, Miller GL, Ben-Dov Y, Hardy NB, 2016. ScaleNet: a literature-based model of scale insect biology and systematics. http://scalenet.info.

Gu YJ, Chen K, Liu HJ, Hu XN, 2013a. Epidemic analysis and control strategy of pests carried by fruits from Thailand. *Plant Quarantine*, 27(1): 81 - 85. [顾渝娟, 陈克, 刘海军, 胡学难, 2013a. 进境泰国水果携带有害生物疫情分析及防控对策. 植物检疫, 27(1): 81 - 85]

Gu YJ, Liang F, Ma J, 2015. Information analysis of scales on imported plant and plant products. *Journal of Biosafety*, 24(3): 208 - 214. [顾渝娟, 梁帆, 马骏, 2015. 中国进境植物及植物产品携带蚧虫疫情分析. 生物安全学报, 24(3): 208 - 214]

Gu YJ, Liu HJ, He RR, Wu MT, Chen K, Hu XN, 2013b. Information analysis of scales on imported fruits from association of Southeast Asian nations. *Plant Quarantine*, 27(5): 95 - 99. [顾渝娟, 刘海军, 何日荣, 武目涛, 陈克, 胡学难, 2013b. 东盟输华水果携带检疫性蚧类害虫疫情分析. 植物检疫, 27(5): 95 - 99]

Hardy NB, Gullan PJ, Hodgson CJ, 2008. A subfamily level classification of mealybugs (Hemiptera: Pseudococcidae) based on integrated molecular and morphological data. *Syst. Entomol*., 33(1): 51 - 71.

He YB, Wan XW, Liu YH, Sun GM, Zhan RL, 2012. Mitochondrial COI from *Dysmicoccus brevipes* (Hemiptera: Pseudococcidae) suggests cryptic lineage and pinpoints the source of the introduction to China. *Fla. Entomol*., 95(1): 183 - 191.

He YB, Wan XW, Zhan RL, Sun GM, Liu YH, Xu ZF, Zhao YL, 2011. Genetic relationship of 12 species of mealybugs (Hemiptera: Pseudococcidae) based on DNA sequences. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 32(12): 2324 - 2330. [何衍彪, 万宣伍, 詹儒林, 孙光明, 刘映红, 许再福, 赵艳龙, 2011. 基于 DNA 序列的 12 种粉蚧亲缘关系分析. 热带作物学报, 32(12): 2324 - 2330]

Hebert PDN, Cywinska A, Ball L, DeWaard JR, 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci*., 270(1512): 313 - 321.

Hebert PDN, Penton EH, Burns JM, Janzen DH, Hallwachs W, 2004. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotroical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101(41): 14812 - 14817.

Ho HY, Hung CC, Chuang TH, Wang WL, 2007. Identification and synthesis of the sex pheromone of the passionvine mealybug, *Planococcus minor* (Maskell). *J. Chem. Ecol*., 33(10): 1986 - 1996.

Hodgson C, Abbas G, Arif MJ, Saeed S, Karar H, 2008. *Phenacoccus solenopsis* Tinsley (Sternorrhyncha: Coccoidea: Pseudococcidae), an invasive mealybug damaging cotton in Pakistan and India, with a discussion on seasonal morphological variation. *Zootaxa*, 1913: 1 - 35.

Huang PY, Lin ZJ, Fang ZP, Cong YH, Lin LL, 2015. Survey of scale insect on imported fruits in Xiamen port. *Plant Quarantine*, 29(3): 85 - 89. [黄蓬英, 林振基, 方志鹏, 丛尧华, 林玲玲, 2015. 厦门口岸进口水果截获蚧虫概况. 植物检疫, 29(3): 85 - 89]

Li JZ, Zhang XY, Chen Y, Lin JC, Dong WY, Zhang S, Chen JH, 2009. Research on pest risk analysis of Taiwan imported fruits.

Chinese Agricultural Science Bulletin, 25(22): 228－235. [李今中, 张晓燕, 陈艳, 林金成, 董文勇, 章溯, 陈金辉, 2009. 台湾进境水果有害生物风险分析研究. 中国农学通报, 25(22): 228－235]

Librado P, Rozas J, 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25(11): 1451－1452.

Liu SS, Zhang GF, Wan FH, 2014. DNA barcoding and phylogenetic analysis of common species of the genus *Bactrocera* (Diptera: Tephritidae) based on mtDNA COI gene sequences. *Acta Entomol. Sin.*, 57(3): 343－355. [刘慎思, 张桂芬, 万方浩, 2014. 基于 mtDNA COI 基因的离腹寡毛实蝇属常见种 DNA 条形码识别和系统发育分析. 昆虫学报, 57(3): 343－355]

Malausa T, Fenis A, Warot S, Germain JF, Ris N, Prado E, Botton M, Vanlerberghe-Masutti F, Sforza R, Cruaud C, Couloux A, Kreiter P, 2011. DNA markers to disentangle complexes of cryptic taxa in mealybugs (Hemiptera: Pseudococcidae). *J. Appl. Entomol.*, 135(1－2): 142－155.

Meier R, Kwong S, Vaidya G, Ng PKL, 2006. DNA barcoding and taxonomy in Diptera: a tale of high intraspecific variability and low identification success. *Syst. Biol.*, 55(5): 715－728.

Millar JG, 2008. Stereospecific synthesis of the sex pheromone of the passionvine mealybug, *Planococcus minor*. *Tetrahedron Lett.*, 49(2): 315－317.

Moritz C, Cicero C, 2004. DNA barcoding: promise and pitfalls. *PLoS Biol.*, 2(10): e354.

Pacheco da Silva VC, Bertin A, Blin A, Germain JF, Bernardi D, Rignol G, Botton M, Malausa T, 2014. Molecular and morphological identification of mealybug species (Hemiptera: Pseudococcidae) in Brazilian vineyards. *PLoS ONE*, 9(7): e103267.

Park DS, Suh SJ, Hebert PDN, Oh HW, Hong KJ, 2011. DNA barcodes for two scale insect families, mealybugs (Hemiptera: Pseudococcidae) and armored scales (Hemiptera: Diaspididae). *Bull. Entomol. Res.*, 101(4): 429－434.

Park DS, Suh SJ, Oh HW, Hebert PDN, 2010. Recovery of the mitochondrial COI barcode region in diverse Hexapoda through tRNA-based primers. *BMC Genomics*, 11: 423.

Pieterse W, Muller DL, Jansen van Vuuren B, 2010. A molecular identification approach for five species of mealybug (Hemiptera: Pseudococcidae) on citrus fruit exported from South Africa. *Afr. Entomol.*, 18(1): 23－28.

Qi GJ, Chen T, Gao Y, Lei YY, Lü LH, 2015. Potential geographic distribution of *Planococcus minor* and *P. lilacinus* in China based on Maxent. *Journal of Environmental Entomology*, 37(2): 219－223. [齐国君, 陈婷, 高燕, 雷妍圆, 吕利华, 2015. 基于 Maxent 的大洋臀纹粉蚧和南洋臀纹粉蚧在中国的适生区分析. 环境昆虫学报, 37(2): 219－223]

Ravuiwasa KT, Lu KH, Shen TC, Hwang SY, 2009. Effects of irradiation on *Planococcus minor* (Hemiptera: Pseudococcidae). *J. Econ. Entomol.*, 102(5): 1774－1780.

Rung A, Miller DR, Scheffer SJ, 2009. Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism method to distinguish three mealybug groups within the *Planococcus citri-P. minor* species complex (Hemiptera: Coccoidea: Pseudococcidae). *J. Econ. Entomol.*, 102(1): 8－12.

Rung A, Scheffer SJ, Evans G, Miller D, 2008. Molecular identification of two closely related species of mealybugs of the genus *Planococcus* (Homoptera: Pseudococcidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 101(3): 525－532.

Shi J, Xie YP, Xue JL, Yao GQ, 2005. Comparative study of methods for isolation of genomic DNA of scale insects. *Chinese Bulletin of Entomology*, 42(2): 207－211. [石晶, 谢映平, 薛皎亮, 姚国亲, 2005. 蚧虫基因组 DNA 不同提取方法的比较. 昆虫知识, 42(2): 207－211]

Singh S, Sharma R, Kumar R, Gupta VK, Dilawari VK, 2012. Molecular typing of mealybug *Phenacoccus solenopsis* populations from different hosts and locations in Punjab, India. *J. Environ. Biol.*, 33(3): 539－543.

Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S, 2011. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.*, 28(10): 2731－2739.

Wang JQ, Xu LY, Li GH, Duan B, Zhang ZB, Wu ZH, 2013. Scale insects on rubber trees in Xishuangbanna. *Plant Protection*, 39(4): 129－133. [王进强, 许丽月, 李国华, 段波, 张祖兵, 吴忠华, 2013. 西双版纳地区寄生橡胶树的蚧虫种类. 植物保护, 39(4): 129－133]

Wang YS, 2016. Identification of Common Mealybug Species Based on Double Genes Barcoding Techniques in China. MSc Thesis, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing. [王玉生, 2016. 我国常见粉蚧类害虫双基因条形码鉴定技术研究. 北京: 中国农业科学院硕士学位论文]

Williams DJ, 1982. The distribution of the mealybug genus *Planococcus* (Hemiptera: Pseudococcidae) in Melanesia, Polynesia and Kiribati. *Bull. Entomol. Res.*, 72(3): 441－455.

(责任编辑: 袁德成)